

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-357537

(P2002-357537A)

(43) 公開日 平成14年12月13日 (2002. 12. 13)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

データ*(参考)

G 0 1 N 21/27

C 0 1 N 21/27

C 2 G 0 5 9

// G 0 1 N 33/543

5 9 5

33/543

5 9 5

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2001-167167(P2001-167167)

(22) 出願日 平成13年6月1日 (2001. 6. 1)

(71) 出願人 000003968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 磯村 哲

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

三菱化学株式会社内

(72) 発明者 宗林 孝明

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

三菱化学株式会社内

(74) 代理人 100092978

弁理士 真田 有

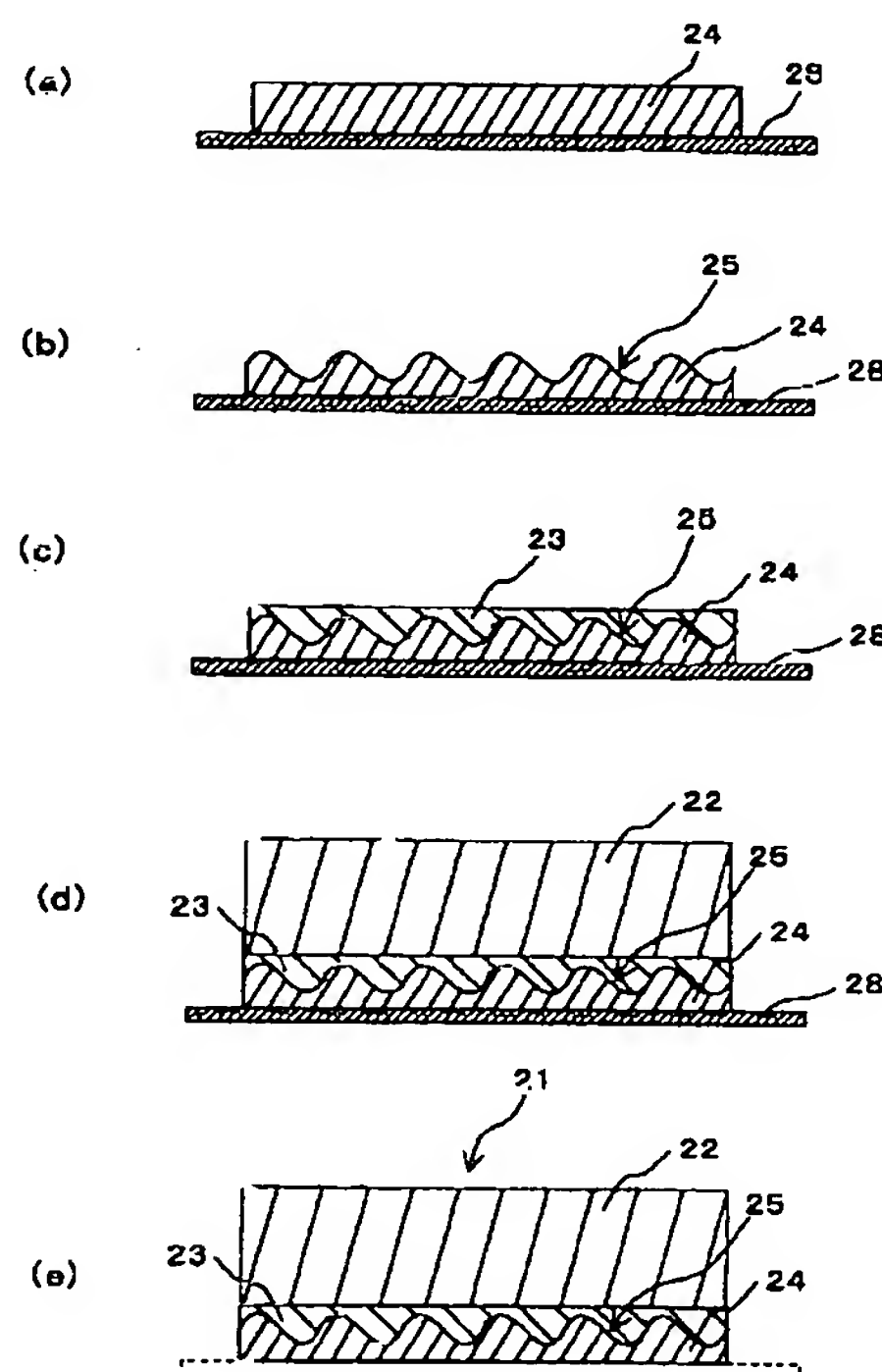
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析素子の製造方法及び分析素子、並びにそれを用いた試料の分析方法

(57) 【要約】

【課題】 表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した試料分析のための分析素子の製造方法に関し、エバネッセント波を誘起する光学構造として回折格子の構造制御及び試料と接触する表面の性状制御を容易にする。

【解決手段】 型24に回折格子25を形成しておき、この型24の回折格子25が形成された側の面に金属膜23を積層し、さらに金属膜23上に基板22を積層することによって、分析素子21の製造工程における金属膜23表面への回折格子25の形成時の操作から蒸着やスパッタリングによる要素を排除する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 型に回折格子を形成するステップと、上記型の上記回折格子が形成された側の面に金属膜を積層するステップと、上記金属膜上に基板を積層するステップとを備えたことを特徴とする、分析素子の製造方法。

【請求項2】 上記型が分析素子の表層を形成する表層膜であることを特徴とする、請求項1記載の分析素子の製造方法。

【請求項3】 基板上に金属膜を積層するステップと、上記金属膜の表面を加工して回折格子を形成するステップとを備えたことを特徴とする、分析素子の製造方法。

【請求項4】 上記金属膜の表面に表層を形成する表層膜を積層するステップをさらに備えたことを特徴とする、請求項3記載の分析素子の製造方法。

【請求項5】 請求項1又は3記載の分析素子の製造方法により製造された分析素子であって、励起光の照射により上記回折格子において生じるエバネッセント波と上記金属膜の表面に生じる表面プラズモン波との共鳴現象を利用して試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うためのSPR用分析素子として構成されていることを特徴とする、分析素子。

【請求項6】 上記金属膜の表面に特定の物質と特異的に結合しうる結合物質が固定化されていることを特徴とする、請求項5記載の分析素子。

【請求項7】 請求項2又は4記載の分析素子の製造方法により製造された分析素子であって、励起光の照射により上記回折格子において生じるエバネッセント波と上記金属膜の表面に生じる表面プラズモン波との共鳴現象を利用して試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うためのSPR用分析素子として構成されていることを特徴とする、分析素子。

【請求項8】 上記表層膜の表面に特定の物質と特異的に結合しうる結合物質が固定化されていることを特徴とする、請求項7記載の分析素子。

【請求項9】 上記表層膜が励起光に対して透過性を有することを特徴とする、請求項8記載の分析素子。

【請求項10】 請求項6又は9記載の分析素子を用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、上記分析素子の上記結合物質が固定化された側の表面に試料を接触させるステップと、上記分析素子に対し上記結合物質が固定化された側から励起光を照射するステップと、上記分析素子からの反射光を検出するステップと、検出した反射光の強度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項11】 上記金属膜及び上記基板が励起光に対して透過性を有することを特徴とする、請求項6又は8

記載の分析素子。

【請求項12】 請求項11記載の分析素子を用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、

上記分析素子の上記結合物質が固定化された側の表面に試料溶液を接触させるステップと、

上記分析素子に対し上記基板側から励起光を照射するステップと、

上記分析素子からの反射光を検出するステップと、検出した反射光の強度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、表面プラズモン共鳴（SPR）を利用した試料分析のための分析素子（表面プラズモン共鳴センサチップ）の製造方法に関し、特に、エバネッセント波を誘起する光学構造として回折格子を備えた分析素子の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、生化学や医療検査等の分野における固相表面における被分析物の分析方法として、表面プラズモン共鳴（SPR）を利用した分析方法が知られている。表面プラズモン共鳴とは、金属表面に光が入射した場合に金属表面の自由電子の粗密波（表面プラズモン波）が入射光により生成されたエバネッセント波に共鳴して励起される現象であり、表面プラズモン共鳴が励起されたときには反射光が減少する特徴がある。表面プラズモン共鳴は入射光の波長及び角度、並びに金属表面の媒質の屈折率に依存しており、媒質の屈折率が変化すれば波長一定の場合には共鳴角が変化し、また、入射角度一定の場合には共鳴波長が変化する。したがって、反射光の強度に基づき共鳴角或いは共鳴波長を調べることで金属表面の媒質の屈折率を分析することができる。そして、金属表面の近傍に被分析物が存在する場合には、金属表面の媒質の屈折率の変化は被分析物の物質量的変化に対応していることから、共鳴角或いは共鳴波長を調べることで被分析物の分析が可能になる。

【0003】表面プラズモン共鳴を起こすには二つの要素が必要である。一つは特定の表面プラズモン波を有する金属であり、もう一つはその表面プラズモン波と共鳴する光波、すなわちエバネッセント波を誘起する光学構造である。エバネッセント波を誘起する光学構造としては現在二つの構造が知られている。一つはプリズムの全反射を利用した光学構造であり、もう一つは回折格子を利用した光学構造である。なお、上記の金属にこれらの光学構造を組み合わせた分析素子は一般に表面プラズモン共鳴センサチップ（SPR用分析素子）と呼ばれている。

【0004】回折格子を備えた分析素子としては特許1

903195号に開示されたものや特許2502222号に開示されたものがある。図10はその従来の回折格子を備えたセンサチップの構造を示した模式図であるが、図10に示すようにこの従来の分析素子100は金属膜（例えば金）101の表面に回折格子102（図中に太線で強調して示している）を備えている。この回折格子102は基板103の表面に周期的な凹凸104を形成し、凹凸104が形成された基板103表面に金属を塗布することによって金属膜101の表面に現されている。金属膜101の膜厚は入射光が透過しない程度の厚さに設定されている。分析素子100の使用時には金属膜101の表面に被分析物106を捕捉するための抗体（結合物質）105が固定化される。抗体105は特定の物質と特異的に結合する性質を備えたものであり、捕捉すべき被分析物106に応じたものが選択されている。

【0005】このような構成により、分析素子100に金属膜101の抗体105が固定化された側から光を照射すると金属膜101表面の回折格子102において入射光が回折し、行き場を失った高次の回折光が平面波化してエバネッセント波となる。仮に単色光のように一定波長の光を照射する場合、入射角が特定の入射角となったときにエバネッセント波と金属膜101表面の表面プラズモン波とが共鳴して強い吸収が生じ、反射光が減少する。抗体105に被分析物106が捕捉されているときにはその物質質量に応じて共鳴角が変化するので、共鳴角の変化量を測定することにより試料中の被分析物106の濃度等进行分析することができる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】従来の分析素子100は金属膜101表面の回折格子102で回折現象を起こさせているため、金属膜101表面の形状は厳密に制御される必要がある。しかしながら、上記のように凹凸104が形成された基板103表面に金属を塗布する場合、凹部には金属がたくさん塗れるかわりに凸部には金属が少ししか塗れないため、従来の分析素子100では金属膜101表面の形状を厳密に制御することは難しかった。また、このように金属膜101表面の形状が回折格子102を形成する条件で最適化されなければならないことから、金属膜101表面の形状は必ずしもその後の化学修飾等の表面処理に有利な状態であるとはいえなかった。

【0007】本発明は、このような課題に鑑み創案されたもので、回折格子の構造制御を容易にした、分析素子の製造方法及び分析素子、並びにそれを用いた試料の分析方法を提供することを目的とする。また、試料と接触する表面の性状制御を容易にした、分析素子の製造方法及び分析素子、並びにそれを用いた試料の分析方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、発明者らは、回折格子形成時の操作から蒸着やスパッタリングによる要素を排除することで、回折格子の構造制御が容易になることを見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明の分析素子の製造方法（第1の製造方法）は、型に回折格子を形成するステップと、上記型の上記回折格子が形成された側の面に金属膜を積層するステップと、上記金属膜上に基板を積層するステップとを備えたことを特徴としている。これにより、基板上に金属膜が積層され、その表面に蒸着やスパッタリングによることなく回折格子が形成された分析素子が製造される。また、上記の製造方法において、上記型を樹脂等で形成してそのまま分析素子の表層を形成する表層膜として用いてもよい。この場合には試料と接触する表面の性状制御を容易にすることができる。

【0009】上記の製造方法に製造された分析素子は、励起光の照射により上記回折格子において生じるエバネッセント波と上記金属膜の表面に生じる表面プラズモン波との共鳴現象（表面プラズモン共鳴）を利用して試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うためのSPR用分析素子として用いられる。

【0010】そして、この分析素子を試料の定量的及び／又は定性的な分析に用いる場合には、上記金属膜の表面に、或いは、上記型としての表層膜が表層を形成している場合には上記表層膜（この場合の表層膜は励起光に対して透過性を有するものとする）の表面に、特定の物質と特異的に結合しうる結合物質を固定化しておき、上記分析素子の上記結合物質が固定化された側の表面に試料を接触させるステップ、上記分析素子に対し上記結合物質が固定化された側から励起光を照射するステップ、上記分析素子からの反射光を検出するステップ、検出した反射光の強度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する。なお、これらの各ステップは、記載順に実行してもよく、同時に実行してもよい。特に、各ステップを同時に実行する場合には、試料中の被分析物が上記結合物質に結合していく様子をリアルタイムでモニタすることができる。

【0011】さらに、上記金属膜及び上記基板が励起光に対して透過性を有する場合には、上記金属膜或いは上記表層膜の表面に結合物質を固定化した後、上記分析素子の上記結合物質が固定化された側の表面に試料溶液を接触させるステップ、上記分析素子に対し上記基板側から励起光を照射するステップ、上記分析素子からの反射光を検出するステップ、検出した反射光の強度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行することができる。このように励起光を分析素子の基板側から照射することで高精度の分析が可能になる。なお、上記各ステップは、記載順に実行してもよく、同時に実行してもよい。

【0012】また、上記の第1の製造方法とは別に、本

発明の分析素子の第2の製造方法は、基板上に金属膜を積層するステップと、上記金属膜の表面を加工して回折格子を形成するステップとを備えたことを特徴としている。この製造方法によっても金属膜の表面に蒸着やスパッタリングによることなく回折格子が形成された分析素子が製造される。また、上記の製造方法において、上記金属膜の表面に樹脂等からなる表層膜を積層するステップをさらに備えてもよい。このように表層に樹脂等からなる表層膜を形成することで試料と接触する表面の性状制御を容易にすることができるようになる。

【0013】上記の製造方法に製造された分析素子は、励起光の照射により上記回折格子において生じるエバネッセント波と上記金属膜の表面に生じる表面プラズモン波との共鳴現象（表面プラズモン共鳴）を利用して試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うためのSPR用分析素子として用いられる。

【0014】そして、この分析素子を試料の定量的及び／又は定性的な分析に用いる場合には、上記金属膜の表面に、或いは、表層に樹脂等からなる表層膜が積層されている場合には上記表層膜（この場合の表層膜は励起光に対して透過性を有するものとする）の表面に、特定の物質と特異的に結合しうる結合物質を固定化しておき、上記分析素子の上記結合物質が固定化された側の表面に試料を接触させるステップ、上記分析素子に対し上記結合物質が固定化された側から励起光を照射するステップ、上記分析素子からの反射光を検出するステップ、検出した反射光の強度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する。なお、これらの各ステップは、記載順に実行してもよく、同時に実行してもよい。

【0015】さらに、上記金属膜及び上記基板が励起光に対して透過性を有する場合には、上記金属膜或いは上記表層膜の表面に結合物質を固定化した後、上記分析素子の上記結合物質が固定化された側の表面に試料溶液を接触させるステップ、上記分析素子に対し上記基板側から励起光を照射するステップ、上記分析素子からの反射光を検出するステップ、検出した反射光の強度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行することができる。このように励起光を分析素子の基板側から照射することで高精度の分析が可能になる。なお、上記各ステップは、記載順に実行してもよく、同時に実行してもよい。

【0016】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照しながら本発明の実施の形態について説明する。

（A）第1実施形態

まず、図1～図3を用いて本発明の第1実施形態について説明する。図1は本実施形態にかかる分析素子の製造方法を示す図である。本実施形態では、従来のように基板に形成した凹凸形状の上に金属をスパッタリング等し

て回折格子を形成するのではなく、金属膜の表面を直接加工して回折格子を形成することを特徴としている。

【0017】具体的には、まず、図1（a）に示すように基板2の表面に金属膜3を積層する。金属膜3の基板2上への積層方法としては、基板2と金属膜3とが十分に強く結合できる方法ならば、その方法に限定はない。代表的には、蒸着、スパッタリング、めっき等により基板2上に金属を塗布することによって金属膜3を積層していく方法がある。その際の金属膜3の膜厚は、次の工程でその表面に回折格子を形成できる限りは任意の厚さに設定することができる。また、金属膜3と基板2との間にさらに何らかの別の物質を例えば接着性を向上させる等の目的で使用することは勿論可能である。この場合は、その物質も本発明にかかる基板の一部としてみなすことができる。

【0018】なお、基板2の材質は金属膜3を保持できる機械的強度が十分であるならばその材質に限定はない。例えば無機材料としてガラス、石英、シリコン、各種金属等があり、有機材料としてはポリメタクリル酸メチル、ポリカーボネート、ポリスチレン等の樹脂が挙げられる。また、金属膜3の材質は表面プラズモン波を誘起されうるものであればその種類に限定はない。例えば、金、銀、アルミニウム等を用いることができる。

【0019】次に、図1（b）に示すように金属膜3の表面を加工して回折格子5を形成する。この場合の金属膜3の加工には、射出成型（スタンプ）、エッチング等の種々の加工方法を用いることができる。なお、形成する回折格子5の形状は、励起光が回折現象を起こしてエバネッセント波を生じせしめることのできる形状であればその形状に限定はない。例えば図1（b）に示すような正弦波状の他、矩形波状や鋸歯状等の形状であってもよい。

【0020】上記の製造方法の具体的な実施例を挙げると次のようになる。まず、①ポリカーボネートの平板（基板）2にクロムを蒸着する。次に、②クロムが蒸着された基板2の表面に金を蒸着して金属膜3を積層する。そして、③スタンプにより回折格子の形状を転写して金属膜3の表面に回折格子5を形成する。これにより、ポリカーボネートの基板2上に金からなる金属膜3が積層され、その表面に回折格子5が形成された分析素子1が製造される。

【0021】このように、本実施形態にかかる製造方法によれば、金属膜3の表面を加工して回折格子5を形成し、回折格子5の形成時の操作から蒸着やスパッタリングによる要素を排除しているので、従来のように金属膜の塗布後の形状を考慮して基板に凹凸を形成する必要がなく、また、回折格子として最適な形状になるように金属膜の塗布を厳密に制御する必要もない。つまり、本実施形態にかかる製造方法によれば、回折格子5の構造制御が容易になるという利点がある。

【0022】なお、以上の方法によって製造された分析素子1の構造によれば、分析素子1に対しその金属膜3側から照射された励起光は金属膜3の表面に形成された回折格子5の回折作用によってエバネッセント波を生じせしめる。このエバネッセント波が金属膜3に作用することにより金属膜3の表面に表面プラズモン波が発生し、特定の波長及び入射角の励起光が照射されたときにエバネッセント波と表面プラズモン波とが共鳴して表面プラズモン共鳴（SPR）が起きる。このような作用により、分析素子1は、表面プラズモン共鳴センサチップ（SPR用分析素子）として用いることができる。

【0023】次に、上記の製造方法によって製造された分析素子1の使用方法について説明する。分析素子1を被分析物の分析に用いる際には、まず、図2に示すように金属膜3の表面に抗体6を固定化する。この抗体6は特定の物質（抗原）と特異的に結合しうる性質を備えた結合物質であり、分析すべき被分析物に応じた抗体6が選択される。抗体6の金属膜3への固定は例えばチオール基とカルボン酸とを有する物質をまず金属膜3の表面に吸着させ、そのカルボン酸をカルボジイミドなどで活性化し、そこに抗体6をアミノ酸を介して結合させることにより行うことができる。なお、抗体6を固定化する前に、金属膜3の表面に保護膜や活性化膜等の何らかのコーティングを行うことにより、金属膜3の表面に何らかの機能を保有させるようにしてもよい。

【0024】そして、このように抗体6が固定化された分析素子1を図3に示す構成の分析装置10にセットして分析を行う。この分析装置10は分析素子1を固定するためのホルダ11、光源12、CCDカメラ13及び分析部14から主に構成されている。ホルダ11には被分析物16を含む試料溶液が通過する流路11aが形成されている。分析素子1はその金属膜3側の表面が流路11aを流れる試料に接するように配置されて固定される。

【0025】光源12は分析素子1に金属膜3側から励起光を照射するように分析素子1に対して流路11aを挟んで配置されている。なお、光源12から照射される励起光は単色光でもよく或いは白色光等の多成分の光でもよく、また、コヒーレントな光でもコヒーレントな光でなくともよい。光源12の分析素子1に対する励起光の入射角度は一定でもよく可変でもよい。また、図3では一つの光源12のみを設けているが複数の光源を設けて同時に異なる角度から入射できるようにしてもよい。

【0026】CCDカメラ13は分析素子1からの反射光を検出する検出器であり、光源12同様に分析素子1に対して流路11aを挟んで配置され励起光が回折して生じる0次の回折光の方向に向けられている。したがって、光源12の入射角度が変わる場合にはCCDカメラ13の分析素子1に対する角度もそれに合わせて変化するようになっている。

【0027】なお、図中では省略しているが、光源12と分析素子1との間、または分析素子1とCCDカメラ13との間には、光源12からの励起光、或いは分析素子1からの反射光を偏光するための偏光子を設置する（好ましくは、光源12と分析素子1との間に設置する）。この偏光子によって、励起光或いは反射光の反射光の測定精度を向上させることができる。

【0028】分析部14はCCDカメラ13からの検出情報を処理する装置である。具体的には、特定波長の光の強度に関するデータの測定、光強度の波長に対する分布に関するデータの測定、或いは、光強度の角度に対する分布に関するデータの測定等、CCDカメラ13からの検出情報に基づいた種々のデータ測定が可能である。そして、これらの測定データに基づき表面プラズモン共鳴による吸収が最大になる、すなわち反射光の強度が最小になる励起光の入射角度或いは波長を算出する機能も有している。また、分析部14には既知の濃度の試料溶液を測定して作成した検量線が記憶されている。この検量線は濃度と共鳴波長及び共鳴角度との関係を記したものであり、表面プラズモン共鳴が起きた時の共鳴波長及び共鳴角度をこの検量線に照らし合わせることで試料溶液中の被分析物16の濃度を測定できる。

【0029】上記構成の分析装置10を用いて試料の濃度分析を行う場合、まず、分析素子1をホルダ11にセットして分析素子1の金属膜3表面を試料に接触させる（ステップA1）。これにより金属膜3表面に固定された抗体6に試料溶液中の被分析物16が特異的に結合する。そして、抗体6に結合した被分析物16の物質質量に応じて金属膜3表面近傍の媒質の屈折率が変化し、金属膜3表面における表面プラズモン波の共鳴条件が変化する。

【0030】次に、光源12から金属膜3表面に向けて励起光を照射する（ステップA2）。照射された励起光はホルダ11の流路11aを通過して金属膜3表面に達し、金属膜3表面に形成された回折格子5において回折光を生じさせる。このうち0次の回折光（反射光）をCCDカメラ13によって検出する（ステップA3）。光源12から照射する励起光が単色光、すなわち単一波長の光の場合、光源12を移動させて励起光の分析素子1に対する入射角度を変化させていく。CCDカメラ13で検出される反射光の強度は励起光の入射角度に応じて変化し、ある入射角度において最小になる。この反射光の強度が最小となる入射角度を分析部14において測定し、測定した角度と励起光の波長とを検量線に対応させて試料溶液中の被分析物の濃度を算出する（ステップA4-1）。

【0031】一方、光源12から照射する励起光が白色光の場合は励起光の分析素子1に対する入射角度は一定にする。この場合、分析素子1からの反射光には多成分の光が含まれる。この反射光を分光器（図示略）で波長

毎に分光し、これをCCDカメラ13で検出する。CCDカメラ13で検出される反射光の強度は各成分の波長毎に異なる。このうち強度が最小である成分の波長を分析部14において測定し、測定した波長と入射角度とを検量線に対応させて、試料溶液中の被分析物の濃度を算出する(ステップA4-2)。

【0032】なお、本実施形態にかかる分析素子1のような表面プラズモン共鳴センサチップ(SPR用分析素子)を用いて分析を行う場合、各ステップA1~A3、及びA4-1或いはA4-2を上述のように順に実行する他に同時に実行することも可能である。各ステップを同時実行する場合には、試料中の被分析物が抗体6に結合していく様子をリアルタイムでモニタすることができる。

【0033】(B)第2実施形態

次に、図4、図5を用いて本発明の第2実施形態について説明する。図4は本実施形態にかかる分析素子の製造方法を示す図である。本実施形態では、予め型に回折格子の形状を形成しておき、その上に金属膜を積層することで金属膜の表面に回折格子を形成することを特徴としている。

【0034】具体的には、まず、図4(a)に示すように支持板28上に型としての膜(表層膜)24を積層する。この表層膜24の材質としては、励起光に対して透過性を有するとともに、後の工程で積層する金属との接着性が高く、且つ後述する抗体を固定化しやすい材質、例えば樹脂が好ましいが、少なくとも励起光に対して透過性を有していればよい。また、表層膜24の膜厚は、少なくとも次工程で回折格子を形成できる程度の厚さに設定する。

【0035】そして、図4(b)に示すように型としての表層膜24に回折格子25を形成する。表層膜24への回折格子25の形成方法としては、射出成型、レーザ加工、UV硬化等の種々の加工方法を用いることができる。なお、形成する回折格子25の形状は、励起光が回折現象を起こしてエバネッセント波を生じせしめることのできる形状であれば第1実施形態と同様に限定はない。

【0036】次に、図4(c)に示すように回折格子25が形成された表層膜24上に金属膜23を積層する。金属膜23の材質は表面プラズモン波を誘起されうるものであればその種類に限定はなく、例えば金、銀、アルミニウム等を用いることができる。金属膜23の表層膜24上への積層方法としては、表層膜24と金属膜23とが十分に強く結合できる方法ならば、その方法に限定はない。代表的には、蒸着、スパッタリング、めっき等により表層膜24上に金属を塗布することによって金属膜23を積層していく方法がある。なお、図4(c)中では、次工程で基板22を積層しやすいように金属膜23の裏面(回折格子25が形成されていない側の面)を

平面状に整形しているが、必ずしもこのような形状に整形する必要はなく、回折格子25の形状がそのまま裏面に現れていてもよい。

【0037】次に、図4(d)に示すように金属膜23上に基板22を積層する。基板22の材質は分析素子の機械的強度を確保できる限りその材質に限定はない。無機材料としてガラス、石英、シリコン、各種金属等、有機材料としてはポリメタクリル酸メチル、ポリカーボネート、ポリスチレン等の樹脂が挙げられる。また、金属膜23への基板22の積層方法は、基板22と金属膜23とが十分に強く結合でき機械的強度を確保できる方法ならばその方法に限定はない。代表的には樹脂の溶液をスピコートする方法等が挙げられる。なお、金属膜23と基板22との間にさらに何らかの別の物質を例えば接着性を向上させる等の目的で使用することは勿論可能である。この場合は、その物質も本発明にかかる基板の一部としてみなすことができる。

【0038】最後に、図4(e)に示すように表層膜24を支えている支持板28を除去する。支持板28の素材とその除去方法は表層膜24、金属膜23及び基板22を損なわない限りは任意の素材や除去方法を適用することができる。例えば樹脂でつくった支持板28を溶剤で除去するようにしてもよい。上記の製造方法の具体的な実施例を挙げると次のようになる。

【0039】まず、①ABS樹脂(支持板)28にポリプロピレンをスピコートして表層膜24を形成する。そして、②その表面に射出成型により回折格子25を形成する。次に、③回折格子25が形成された表層膜24の表面にクロムを蒸着し、④その上に金を蒸着して金属膜23を積層する。さらに、⑤金属膜23上にポリプロピレンをスピコートして基板22を積層する。そして最後に、⑥ABS樹脂の支持板28をアセトンで除去する。これにより、ポリプロピレンの基板22上に金からなる金属膜23とポリプロピレンからなる表層膜24が積層され、金属膜23と表層膜24との境界面に回折格子25が形成された分析素子21が製造される。

【0040】このように、本実施形態にかかる製造方法によれば、型(表層膜)24に形成された回折格子25の形状を金属膜23の表面に転写することによって、回折格子25の形成時の操作から蒸着やスパッタリングによる要素を排除しているため、従来のように金属膜の塗布後の形状を考慮して基板に凹凸を形成する必要がなく、また、回折格子として最適な形状になるように金属膜の塗布を厳密に制御する必要もない。つまり、本実施形態にかかる製造方法によれば、回折格子25の構造制御が容易になるという利点がある。

【0041】なお、以上の方法によって製造された分析素子21の構造によれば、分析素子1に対しその表層膜24側から照射された励起光は金属膜23の表面(金属膜23と表層膜24との境界面)に形成された回折格子

25の回折作用によってエバネッセント波を生じせしめる。このエバネッセント波が金属膜23に作用することにより金属膜23の表面に表面プラズモン波が発生し、特定の波長及び入射角の励起光が照射されたときにエバネッセント波と表面プラズモン波とが共鳴して表面プラズモン共鳴が起きる。このような作用により、分析素子21は、表面プラズモン共鳴センサチップ（SPR用分析素子）として用いることができる。

【0042】次に、上記の製造方法によって製造された分析素子21の使用方法について説明する。分析素子21を被分析物の分析に用いる際には、まず、図5に示すように表層膜24の表面に抗体26を固定化する。抗体26の表層膜24への固定は例えば物理吸着等により行うことができる。本実施形態にかかる分析素子21によれば、金属膜23の上に表層膜24を備えることによって試料と接触する表面が表面プラズモン波を有効に誘起しうる金属に限定されないで、表面性状の制御に適した材質を広く選択することができる。なお、抗体26を固定化する前に、表層膜24の表面に保護膜や活性化膜等の何らかのコーティングを行うことにより、表層膜24の表面に何らかの機能を保有させるようにしてもよい。

【0043】そして、本実施形態では上記のように抗体26が固定化された分析素子21を第1実施形態と同構成の分析装置（図3参照）にセットして分析を行う。ここでは第1実施形態の分析装置10を用いて分析を行うものとし、図3を参照しながら本実施形態にかかる分析素子21を用いた試料の分析方法について説明する。まず、図3に示す分析装置10のホルダ11に分析素子21をセットして分析素子21の表層膜24表面を試料に接触させる（ステップB1）。これにより表層膜24表面に固定された抗体26に試料溶液中の被分析物16が特異的に結合する。そして、抗体26に結合した被分析物16の物質質量に応じて金属膜23表面近傍の媒質の屈折率が変化し、金属膜23表面における表面プラズモン波の共鳴条件が変化する。

【0044】次に、光源12から表層膜24表面に向けて励起光を照射する（ステップB2）。照射された励起光はホルダ11の流路11aを通して表層膜24に達し、さらに表層膜24を通して金属膜23の表面（表層膜24と金属膜23との境界面）に形成された回折格子25において回折光を生じさせる。このうち0次の回折光（反射光）をCCDカメラ13によって検出する（ステップB3）。そして、CCDカメラ13からの検出情報に基づき、第1実施形態と同様の方法により試料溶液中の被分析物の濃度を算出する（ステップB4）。なお、本実施形態でも、各ステップB1～B4は上述のように順に実行する他に同時に実行することも可能である。

【0045】（C）第3実施形態

次に、図6～図8を用いて本発明の第2実施形態について説明する。図6は本実施形態にかかる分析素子の製造方法を示す図である。本実施形態では、第2実施形態と同様に予め型に回折格子の形状を形成しておき、その上に金属膜を積層することで金属膜の表面に回折格子を形成することを特徴としている。

【0046】具体的には、まず、図6（a）に示すように支持板38上に型としての膜（表層膜）34を積層する。この表層膜34の材質としては、後の工程で積層する金属との接着性が高く、且つ後述する抗体を固定化しやすい材質、例えば樹脂が好ましいが、必ずしもそれに限定されるものではない。表層膜34の膜厚は、少なくとも次工程で回折格子を形成できる程度の厚さに設定する。

【0047】そして、図6（b）に示すように型としての表層膜34に回折格子35を形成する。表層膜34への回折格子35の形成方法としては、射出成型、レーザ加工、UV硬化等の種々の加工方法を用いることができる。なお、形成する回折格子35の形状は、励起光が回折現象を起こしてエバネッセント波を生じせしめることのできる形状であれば第1実施形態と同様に限定はない。

【0048】次に、図6（c）に示すように回折格子35が形成された表層膜34上に金属膜33を積層する。金属膜33の材質は表面プラズモン波を誘起されうるものであればその種類に限定はなく、例えば金、銀、アルミニウム等を用いることができる。金属膜33の表層膜34上への積層方法としては、蒸着、スパッタリング、めっき等が挙げられる。なお、本実施形態では、金属膜33の裏面側（回折格子35が形成されていない側の面）から回折格子35が形成されている面へ励起光が届くようにする必要があるため、金属膜33の膜厚は励起光に対して透過性を確保できる程度の薄さとする。したがって、回折格子35の形状がそのまま金属膜33の裏面に現れていてもよい。回折格子35の構造制御は金属膜33と表層膜34との境界面で行われるので従来のように金属膜の厳密な制御は必要なく、このように極めて自由な形状を採用することができる。このことは第2実施形態についても同様である。

【0049】次に、図6（d）に示すように金属膜33上に基板32を積層する。基板32の材質は励起光に対して透過性を有し（好ましくは十分に透明であり）、且つ、分析素子の機械的強度を確保できる限りその材質に限定はない。無機材料としてガラス、石英、シリコン等、有機材料としてはポリメタクリル酸メチル、ポリカーボネート、ポリスチレン等の樹脂が挙げられる。また、金属膜33への基板32の積層方法は、基板32と金属膜33とが十分に強く結合でき機械的強度を確保できる方法ならばその方法に限定はない。なお、本実施形態でも金属膜33と基板32との間にさらに何らかの別

の物質を例えば接着性を向上させる等の目的で使用可能である。最後に、図6(e)に示すように表層膜34を支えている支持板38を除去する。支持板38の素材とその除去方法については第2実施形態と同様である。

【0050】このように、本実施形態にかかる製造方法によれば、型(表層膜)34に形成された回折格子35の形状を金属膜33の表面に転写することによって、回折格子35の形成時の操作から蒸着やスパッタリングによる要素を排除しているため、従来のように金属膜の塗布後の形状を考慮して基板に凹凸を形成する必要がなく、また、回折格子として最適な形状になるように金属膜の塗布を厳密に制御する必要もない。つまり、本実施形態にかかる製造方法によれば、回折格子35の構造制御が容易になるという利点がある。

【0051】なお、以上の方法によって製造された分析素子31の構造によれば、分析素子31に対しその基板32側から励起光が照射されると励起光は基板32及び金属膜33を通過して金属膜33の表面(金属膜33と表層膜34との境界面)に達し、金属膜33の表面に形成された回折格子35で回折する。この回折現象により生じたエバネッセント波が金属膜33に作用することにより金属膜33の表面に表面プラズモン波が発生し、特定の波長及び入射角の励起光が照射されたときにエバネッセント波と表面プラズモン波とが共鳴し、表面プラズモン共鳴が起きる。このような作用により、分析素子31は、表面プラズモン共鳴センサチップ(SPR用分析素子)として用いることができる。

【0052】次に、上記の製造方法によって製造された分析素子31の使用方法について説明する。分析素子31を被分析物の分析に用いる際には、まず、図7に示すように表層膜34の表面に抗体36を固定化する。抗体36の表層膜34への固定は例えば物理吸着等により行うことができる。本実施形態にかかる分析素子31も第2実施形態と同様に試料と接触する表面が表面プラズモン波を有効に誘起しうる金属に限定されないため、第2実施形態と同様、表面性状の制御に適した材質を広く選択することができる。なお、抗体36を固定化する前に、表層膜34の表面に保護膜や活性化膜等の何らかのコーティングを行うことにより、表層膜34の表面に何らかの機能を保有させるようにしてもよい。

【0053】そして、本実施形態では上記のように抗体36が固定化された分析素子31を図8に示す構成の分析装置20にセットして分析を行う。この分析装置20は第1実施形態と同様に分析素子31を固定するためのホルダ11、光源12、CCDカメラ13及び分析部14から主に構成されている。各構成機器11～14の機能は第1実施形態と同様であるが、本実施形態では、分析素子31に基板32側から励起光を照射してその反射光を検出するように、分析素子31に対し流路11aと反対側に光源12とCCDカメラ13を配置したことを

特徴としている。

【0054】上記構成の分析装置20を用いて試料の濃度分析を行う場合、まず、分析素子31をホルダ11にセットして分析素子31の表層膜34表面を試料に接触させる(ステップC1)。これにより表層膜34表面に固定された抗体36に試料溶液中の被分析物16が特異的に結合する。そして、抗体36に結合した被分析物16の物質質量に応じて表層膜34表面近傍の媒質の屈折率が変化する。表層膜34表面における表面プラズモン波の共鳴条件が変化する。

【0055】次に、光源12から基板32表面(分析素子31の裏面)に向けて励起光を照射する(ステップC2)。照射された励起光は基板32及び金属膜33を通過して金属膜33と表層膜34の境界面に達し、この境界面に形成された回折格子35において回折光を生じさせる。このうち0次の回折光(反射光)をCCDカメラ13によって検出する(ステップC3)。そして、CCDカメラ13からの検出情報に基づき、第1実施形態と同様の方法により試料溶液中の被分析物の濃度を算出する(ステップC4)。なお、本実施形態でも、各ステップC1～C4は上述のように順に実行する他に同時に実行することも可能である。

【0056】このように本実施形態では励起光は分析素子31に対し基板32側から照射される。従来の分析素子や第1～第2実施形態では、抗体が不透明である場合や抗体を金属に結合させるための固定化剤が不透明である場合、或いは試料溶液が励起光付近に散乱や吸収を有する物質の溶液である場合には得られる反射光の減少により正確な表面プラズモン共鳴の測定が難しいが、本実施形態のように基板32側から励起光を照射する場合にはそのような不具合はない。つまり、本実施形態にかかる分析素子31を用いた分析方法によれば、抗体や試料溶液の性状の影響を受けることなく常に正確な分析が可能になるという利点がある。

【0057】(D)その他

以上、本発明の実施の形態について説明したが、本発明は上述の実施の形態に限定されるものではなく本発明の趣旨を逸脱しない範囲で種々変形して実施することができる。例えば、第1実施形態では励起光を金属膜3側から照射しているが、基板2を励起光に対して透過性のある材質にするとともに、金属膜3の膜厚を励起光に対して透過性を確保できる程度の薄さにして、第3実施形態のように基板2側から励起光を照射するようにしてもよい。

【0058】また、第1実施形態にかかる分析素子において金属膜3の表面にさらに樹脂等からなる表層膜を積層し、この表層膜の表面に抗体を固定するようにしてもよい。また、第1実施形態にかかる分析素子において基板2の上に金属膜3を積層するのではなく、図9に示す分析素子1'のように金属膜3の膜厚を厚くして金属膜

3自体に機械的強度を持たせるようにしてもよい。この場合も第1実施形態と同様の方法で回折格子5を形成することができる。

【0059】さらに、第2、第3実施形態では回折格子25、35を予め形成しておく型をそのまま分析素子の表層膜として用いているが、基板22、32の形成後に型から金属膜23、33の表面を取り外して基板22、32と金属膜23、33とからなる分析素子として用いることも勿論可能である。

【0060】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明の分析素子の製造方法（第1の製造方法）によれば、予め型に回折格子の形状を形成しておき、その上に金属膜を積層することによって金属膜の表面に回折格子を形成するので、回折格子の形成時の操作から蒸着やスパッタリングによる要素を排除することができ、回折格子の構造制御が容易になるという利点がある。特に、上記型をそのまま分析素子の表層を形成する表層膜として用いる場合には、表面性状の制御に適した材質を広く選択することができ、試料と接触する表面の性状制御が容易になるという利点がある。

【0061】また、本発明の分析素子の製造方法（第2の製造方法）によれば、金属膜の表面を直接加工して回折格子を形成するので、回折格子の形成時の操作から蒸着やスパッタリングによる要素を排除することができ、回折格子の構造制御が容易になるという利点がある。さらに、上記の各製造方法において製造される分析素子をSPR用分析素子として構成する場合において、基板及び金属板を励起光に対して透過性を有するものにして、その基板側から励起光を照射して試料の分析を行う場合には、表面プラズモン共鳴の測定に表面の結合物質や試料の性状の影響を受けることなく、常に正確な分析が可能になるという利点がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の第1実施形態にかかる分析素子の製造方法を示す図であり、(a)、(b)の順に製造手順を示している。

【図2】第1実施形態にかかる製造方法により製造された分析素子に抗体を固定化した状態を示す模式的断面図である。

【図3】本発明の第1実施形態にかかる分析装置の構成を示す模式図である。

【図4】本発明の第2実施形態にかかる分析素子の製造方法を示す図であり、(a)～(e)の順に製造手順を示している。

【図5】第2実施形態にかかる製造方法により製造された分析素子に抗体を固定化した状態を示す模式的断面図である。

【図6】本発明の第3実施形態にかかる分析素子の製造方法を示す図であり、(a)～(e)の順に製造手順を示している。

【図7】第3実施形態にかかる製造方法により製造された分析素子に抗体を固定化した状態を示す模式的断面図である。

【図8】本発明の第3実施形態にかかる分析装置の構成を示す模式図である。

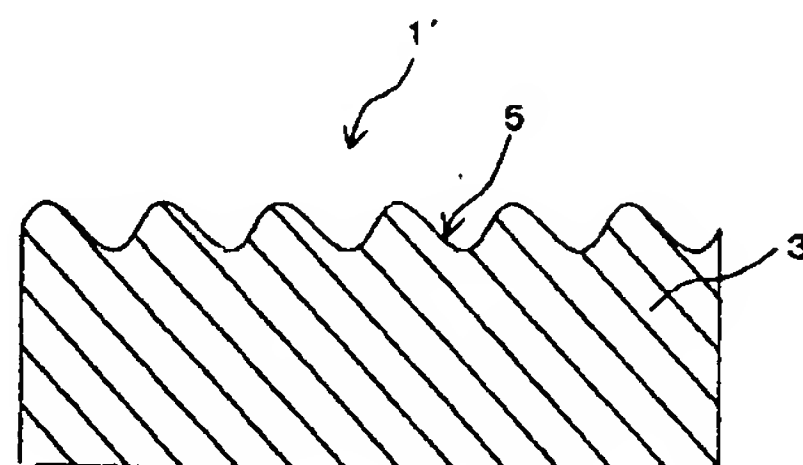
【図9】本発明の第1実施形態にかかる分析素子の変形例を示す模式的断面図である。

【図10】従来の分析素子の構成を示す模式的断面図である。

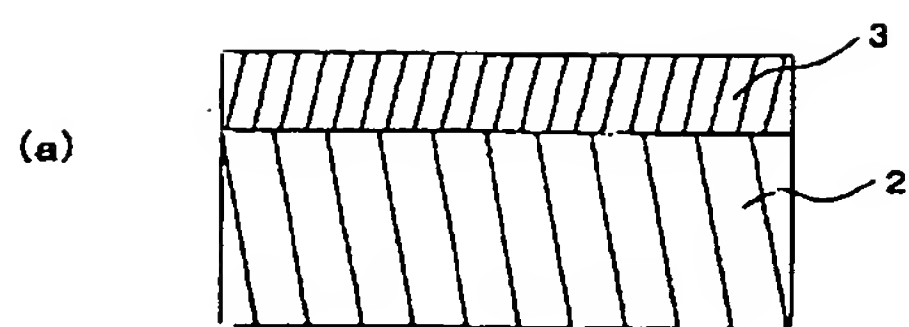
【符号の説明】

- 1 分析素子（SPR用分析素子）
- 2 基板
- 3 金属膜
- 4 表層膜
- 5 回折格子
- 6 抗体（結合物質）
- 28 支持板
- 10、20 分析装置
- 11 ホルダ（固定手段）
- 12 光源
- 13 CCDカメラ（検出手段）
- 14 分析部（分析手段）
- 21、31 分析素子（SPR用分析素子）
- 22、32 基板
- 23、33 金属膜
- 24、34 表層膜
- 25、35 回折格子
- 26、36 抗体（結合物質）
- 28 支持板

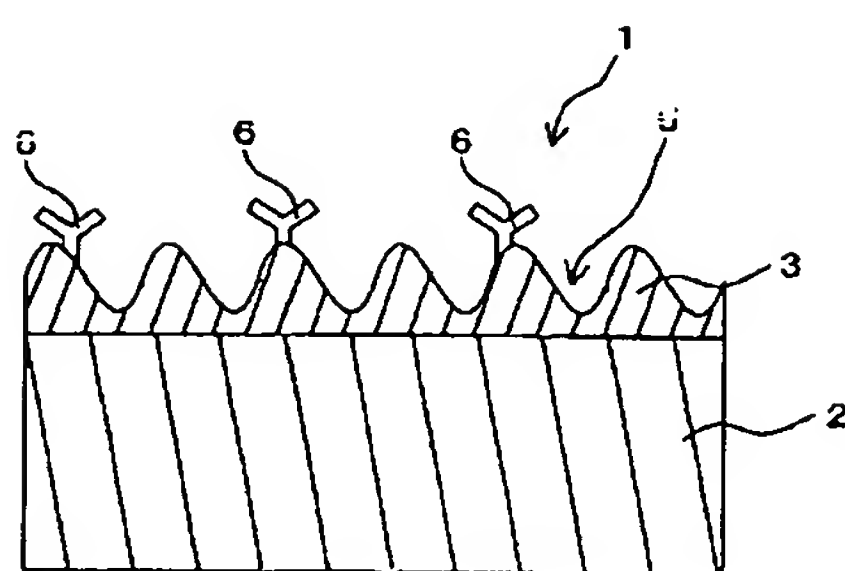
【図9】



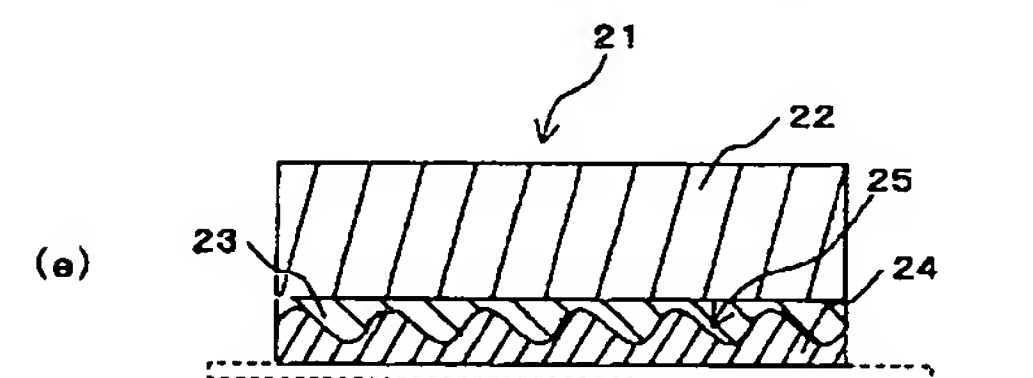
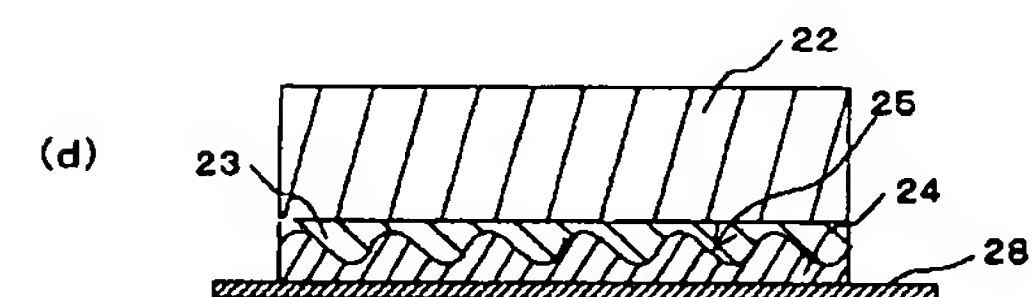
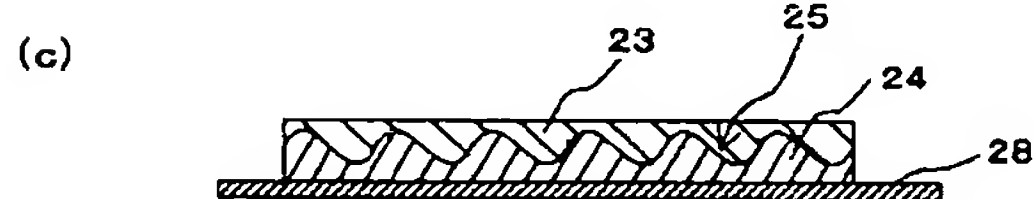
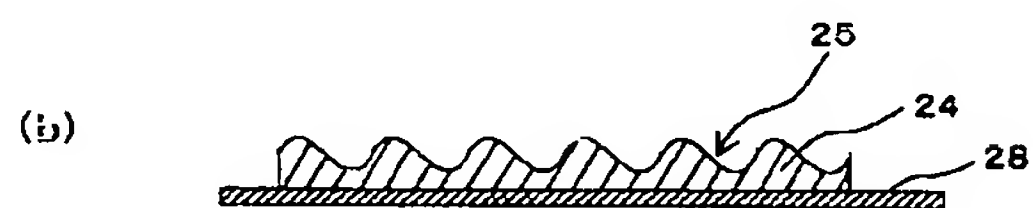
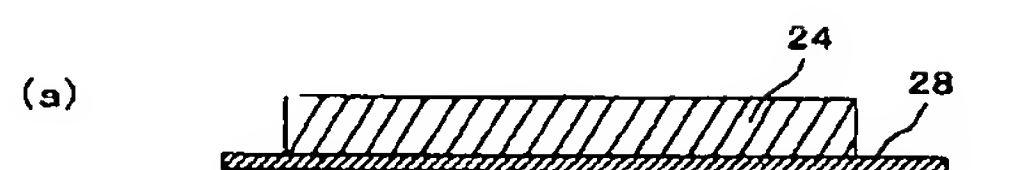
【図1】



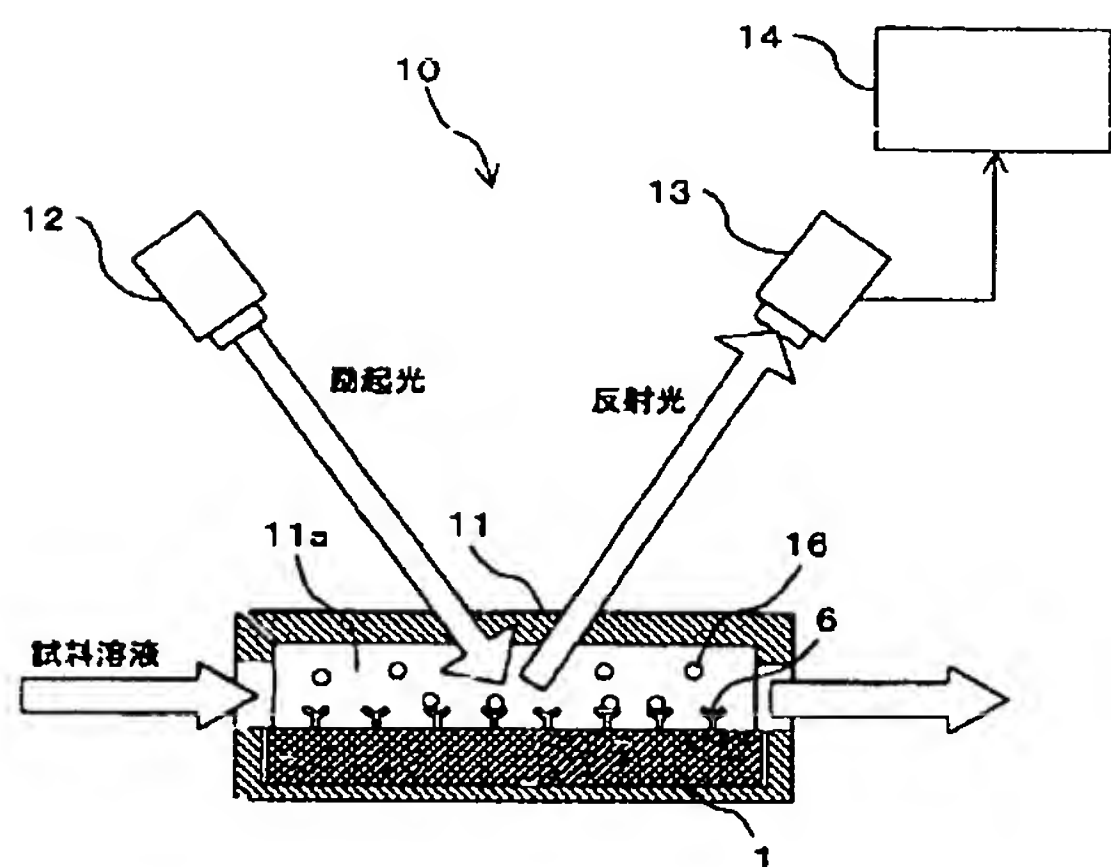
【図2】



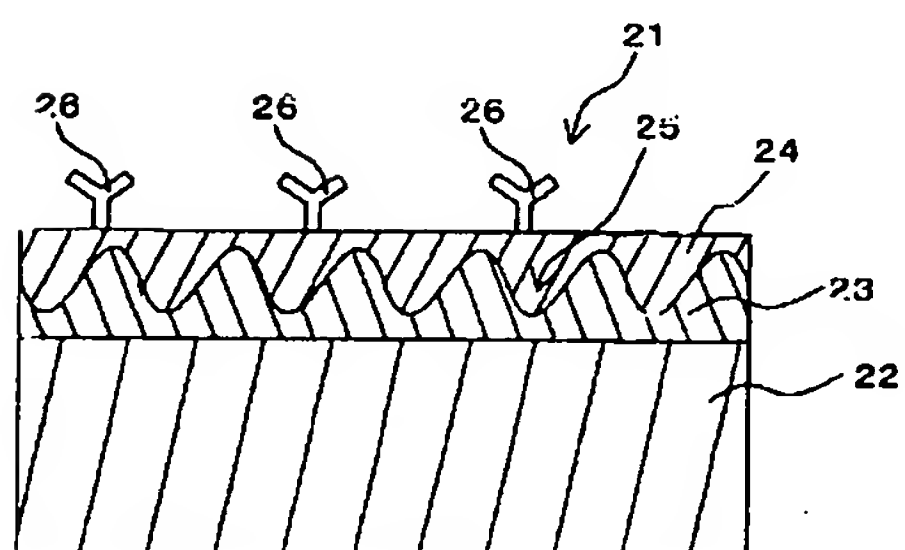
【図4】



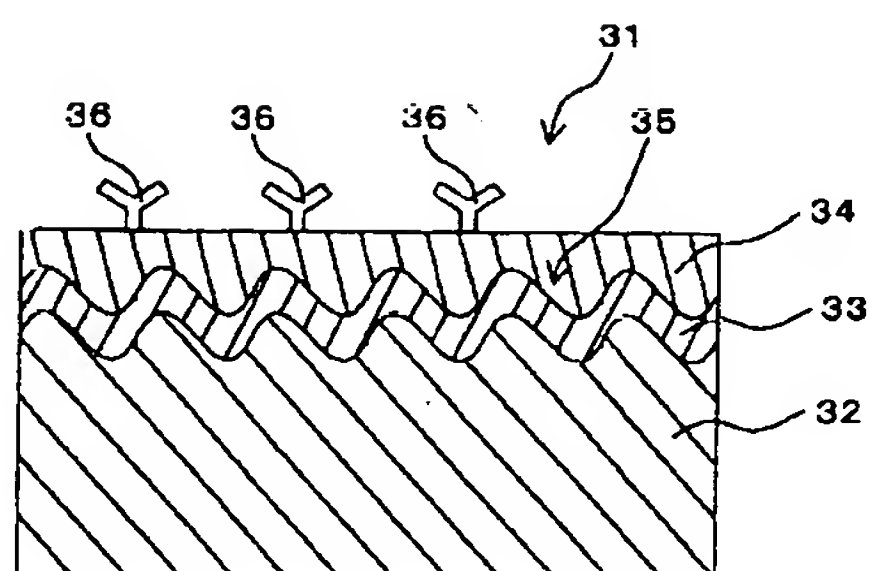
【図3】



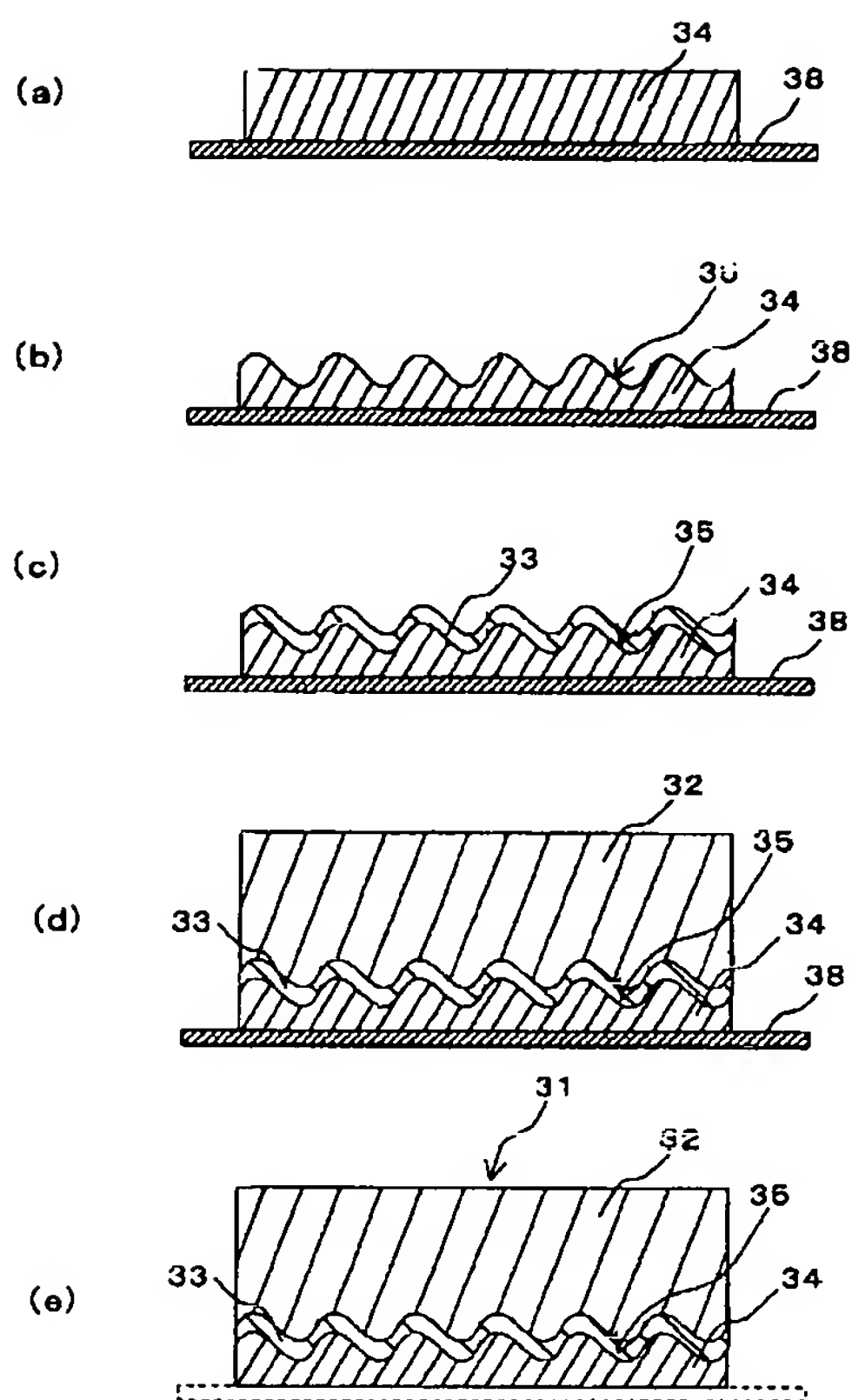
【図5】



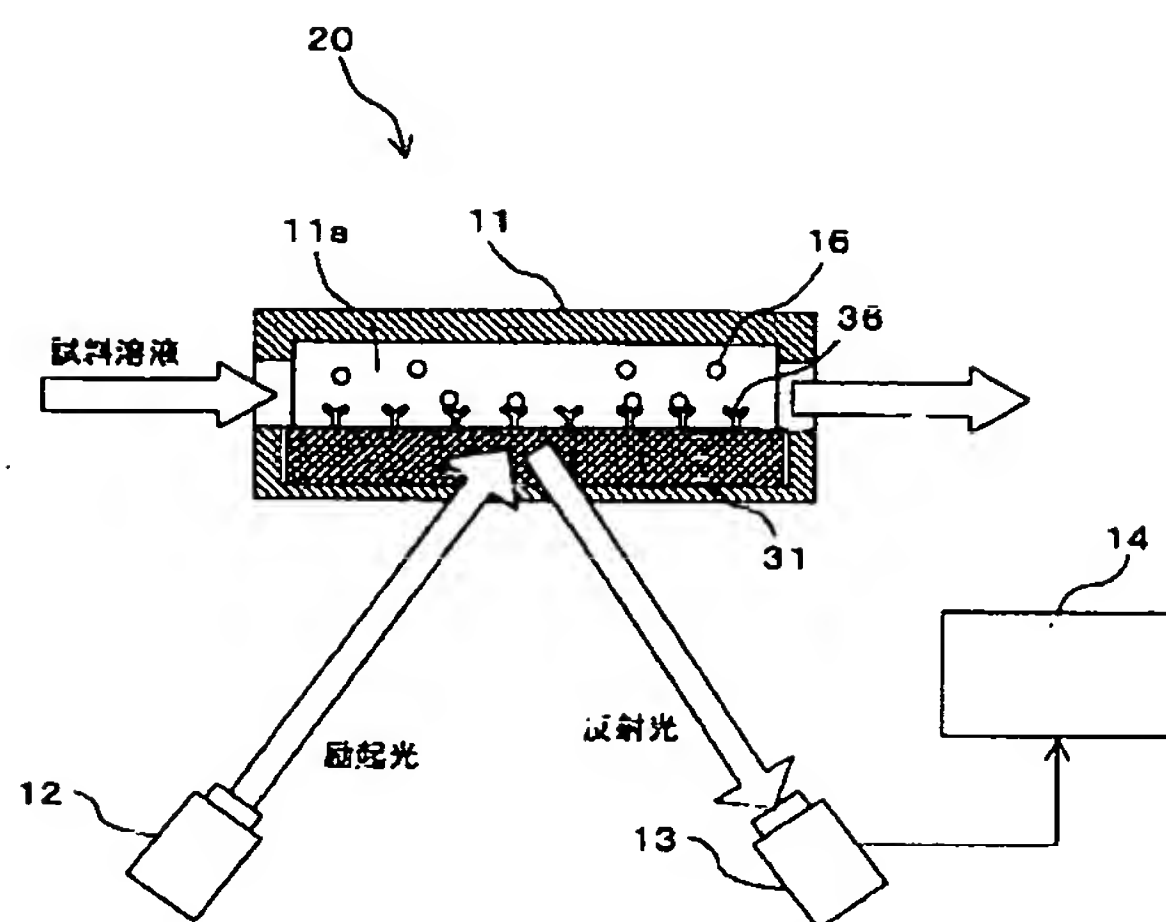
【図7】



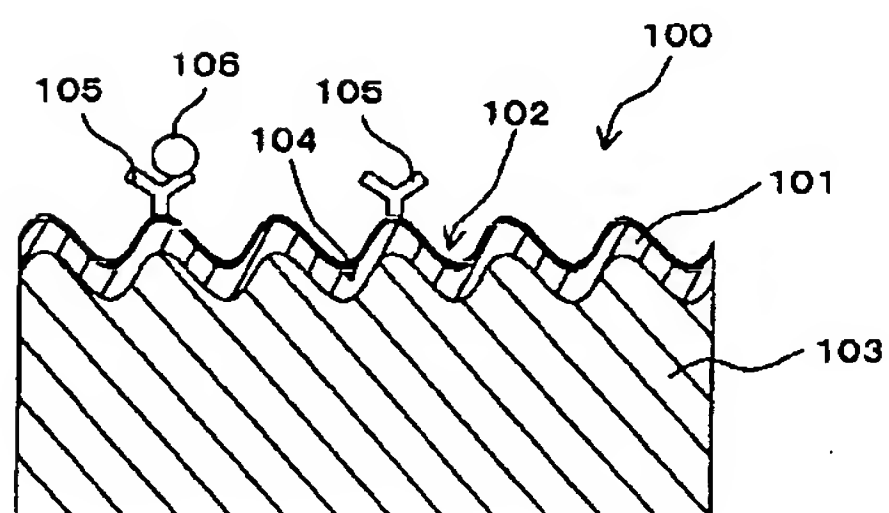
【図6】



【図8】



【図10】



フロントページの続き

(72)発明者 大平落 嘉寛
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地
三菱化学株式会社内

Fターム(参考) 2G059 BB04 BB12 EE02 GG01 GG03
GG04 HH02 JJ19 KK04